

(19) BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

(12) **Offenlegungsschritt**

(10) **DE 42 38 842 A 1**

AJ

97F-237

(51) Int. Cl. 5:

C 12 P 1/00

C 12 N 1/10

// C12N 9/16, 9/48,

9/24, 9/38, 9/40, C12P

7/66, C12Q 1/00,

A61K 7/42

- (21) Aktenzeichen: P 42 38 842.2
(22) Anmeldetag: 17. 11. 92
(43) Offenlegungstag: 19. 5. 94

(71) Anmelder:

Tiedtke, Arno, Prof. Dr., 4400 Münster, DE; Kiy,
Thomas, Dipl.-Biol., 4400 Münster, DE

(72) Erfinder:

gleich Anmelder

(54) Hochzelldichte Fermentation von Ciliaten zur Gewinnung von Naturstoffen

DE 42 38 842 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 03. 94 408 020/461

5/47

DE 42 38 842 A 1

Beschreibung

Es ist bekannt, daß einige Ciliatenspezies, wie etwa Tetrahymena, bestimmte Enzyme in das umgebende Medium sezernieren (Müller, 1972). Die sezernierten Enzyme wurden bisher nur im Labormaßstab gewonnen, wobei einfache batch-Fermentationen durchgeführt wurden. Dabei werden z. B. 500-ml-Erlenmeyerkolben, die 130 ml frisches Medium enthalten, mit Zellen angeimpft (Blum, 1975). Nach dem Erreichen der Statio-närphase werden die Zellen durch Zentrifugations-schritte von dem enzymhaltigen Medium abgetrennt. Bisher wurden Zuchtmédien verwendet, die sich z. B. aus Proteose Pepton und Hefe Extrakt oder Leber Extrakt zusammensetzen und die Nährstoffe in überwie-gend gelöster Form enthalten. Bei dem beschriebenen Verfahren liegt die maximale Zellkonzentration unter 10^6 Zellen/ml (Rasmussen & Modeweg-Hansen, 1973) und die Generationszeit bei über 2 h, wenn etwa Tetra-hymena thermophila fermentiert wird. Die maximalen Enzymausbeuten betragen z. B. 100 mU β -Hexosaminidase und saure Phosphatase pro ml Medium. Obwohl man weiß, daß Ciliaten wie z. B. Tefrahymena ein besse-res Wachstum aufweisen, wenn die Nährstoffe in parti-kulärer statt gelöster Form vorliegen (Rasmussen & Modeweg-Hansen, 1973), wurde solch ein axenisches Zuchtmedium bisher nicht beschrieben.

Der im Patentanspruch 1 angegebenen Erfindung liegt das Problem zugrunde, daß die Ciliaten sich bei den bisher verwendeten Zuchtverfahren und -medien relativ schlecht vermehren ließen, woraus niedrige Ausbeuten bezüglich der Biomasse und wertvoller sezernierter Naturstoffe wie Enzyme, Melanine und Extrusomen resul-tierten. Weiterhin mußten die Zellen bisher in arbeits-aufwendigen Zentrifugations- bzw. Filtrationsschritten vom enzymhaltigen Kulturmedium abgetrennt werden.

Dieses Problem wird durch die im Patentanspruch 1 aufgeführten Merkmale gelöst.

Die mit der Erfindung erzielten Vorteile bestehen ins-sondere darin, daß Ciliaten der Gattungen Tetrahy-mena und Colpidium sich sehr schnell vermehren (Ge-nisationszeit: 1,4 h) und Zeldichten von über 2×10^7 Zellen/ml (entspricht einer Trockenmasse von etwa 50 g/l) erreichen, wodurch eine enorm hohe Produktiv-iät bezüglich der sezernierten Substanzen gegeben ist. Der kontinuierliche Austausch des Kulturmediums über ein Membransystem, das die Zellrückhaltung im Fer-menter gewährleistet, ermöglicht es kontinuierlich über Monate große Mengen an Enzymen, Melaninen und Extrusomen zu gewinnen. Weitere Vorteile sind, daß dieselben Zellen über einen langen Zeitraum zur Pro-duk-tion genutzt werden können, und daß aufwendige Arbeitsschritte zur Abtrennung des Mediums von den Zellen entfallen. Das gute Wachstum (und somit die ho-hen Ausbeuten) wird durch den Einsatz eines Kulturme-diums, das im Gegensatz zu den bisher üblichen axeni-schen Medien die Nährsubstanzen überwiegend in parti-kulärer Form enthält, ermöglicht. Dies wird erreicht durch die Verwendung von Magermilchpulver als Nähr-substrat. Durch Autoklavieren des Mediums wird be-wirkt, daß das Milcheiweiß koaguliert und aus der lösli-chen in die partikuläre Form übergeht. Dieses Kultur-meidum enthält im wesentlichen Magermilchpulver und kostet somit nur Bruchteile des bislang verwendet-en PPYS Mediums, was als Vorteil für eine kommerzielle Nutzung des Systems gesehen werden muß.

Ein Ausführungsbeispiel der Erfindung ist dem beige-legten Manuskript einer Publikation, die am 19.11.92

erscheinen soll, zu entnehmen.

Literatur

- 5 Blum, J. J. (1975) Effects of Metabolites Present Du-ring Growth of Tetrahymena pyriformis on the Subse-quent Secretion of Lysosomal Hydrolases. *J. Cell. Physiol.* 86: 131—142.
 Müller, M. (1972) Secretion of Acid Hydrolases and its 10 Intracellular Source in Tetrahymena pyriformis. *J. Cell Biol.* 52 : 478—487.
 Rasmussen, L. and Modeweg-Hansen, L. (1973) Cell multipli-cation in Tetrahymena cultures after addition of particulate material. *J. Cell Sci.* 12 : 275—286.
- 15

Ausbeuten

1 ml zellfreier Überstand aus unserem Verfahren ent-hält ca. 25000 mU saure Phosphatase und 14000 mU β -Hexosaminidase, während 1 ml zellfreier Überstand aus herkömmlichen batch-Verfahren nur etwa 100 mU beider Enzyme enthält. Ähnliche Verhältnisse findet man bei allen weiteren Enzymen. Für 50000 mU β -He-xosaminidase (aus Rinderniere) der Fa. Boehringer Mannheim zahlt man 274,- DM und für 60000 mU saure Phosphatase 70,- DM. Weiterhin lassen sich mit unse-rem System große Mengen PDE I, die heute noch aus Schlangengiften gewonnen wird, PDE II, Protease, al-pha-Mannosidase, alpha-Glucosidase, β -Glucosidase, 30 Phospholipase C, Phospholipase A₁ u. a. Enzyme produ-zieren (siehe auch Abb. 1). Durch den Einsatz geeigne-ter Mutanten konnten außerdem große Mengen Mel-a-nine gewonnen werden.

Anwendungsbeispiele

Die genannten Enzyme sind von kommerzieller Be-deutung und finden Verwendung in Bereichen der Dia-gnostik, Lebensmittelchemie, Analytik und Moleku-larbiologie. Da geeignete Quellen bisher nicht zur Verfü-gung standen, wird die PDE I z. B. noch aus Schlangen-gift, die PDE II aus Kalbsmilz, die β -Hexosaminidase aus Rinderniere und die β -Glucosidase aus Süßmandeln ge-wonnen. Melanine werden aufgrund ihrer Eigenschaft, UV Strahlen zu absorbieren, zur Herstellung von Son-nenschutzcremes eingesetzt.

Patentanspruch

Verfahren zur Hochzelldichte-Fermentation von Ciliaten (Gattungen: Tetrahymena, Colpidium) auf axenischem Medium insbesondere zur Gewinnung von sezernierten Naturstoffen dadurch gekenn-zeichnet, daß die Ciliaten kontinuierlich mit einem billigen Nährmedium versorgt werden, das die Nährstoffe in überwiegend partikulärer Form ent-hält, während das mit wertvollen Naturstoffen an-gereicherte, verbrauchte Kulturmedium, bei gleich-zeitiger Rückhaltung der Zellen im Zuchtgefäß, über ein Polypropylenmembransystem geerntet wird.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

